

学校编码：10384
学号：22420091151146

密级_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

不同形态变异类型日本囊对虾的
遗传多样性及形态差异分析

Genetic Diversity and Morphological Difference between
Two Varieties of *Marsupenaeus japonicus*

何永琴

指导教师姓名：王 军 教授
专 业 名 称：海洋生物学
论文提交日期：2012 年 5 月
论文答辩时间：2012 年 6 月

带格式的：加宽量 1.4 磅
带格式的：加宽量 0.1 磅
带格式的：加宽量 1.85 磅
带格式的：加宽量 0.05 磅

2012年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
缩略语中英文对照表.....	V
第 1 章 绪 论.....	1
1.1 遗传多样性	1
1.1.1 遗传多样性含义及研究意义	1
1.1.2 遗传多样性研究方法	2
1.2 微卫星标记	5
1.2.1 微卫星标记简介	5
1.2.2 微卫星标记技术在对虾遗传育种中的应用	6
1.3 日本囊对虾简介及研究现状	12
1.3.1 日本囊对虾的分类地位和形态特征.....	12
1.3.2 日本囊对虾的地理分布及生活习性.....	15
1.3.3 日本囊对虾的性腺发育	16
1.3.4 日本囊对虾的研究现状	18
1.4 研究目的意义	21
第 2 章 用微卫星标记分析不同形态变异类型日本囊对虾的遗传多样性.....	22
2.1 材料	22
2.1.1 实验材料	22
2.1.2 主要仪器	23
2.1.3 主要试剂	24
2.1.4 主要溶液配制	24
2.2 方法	25
2.2.1 总 DNA 的提取	25

2.2.2 多态性检测	25
2.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测	27
2.2.4 数据统计分析	28
2.3 结果	28
2.3.1 PCR 扩增结果	28
2.3.2 群体的遗传多样性分析	29
2.3.3 群体变异分析	32
2.4 讨论	35
2.4.1 群体遗传多样性	35
2.4.2 Hardy-Weinberg 平衡	36
2.4.3 群体间遗传分化	36
第 3 章 不同形态变异类型日本囊对虾的性腺发育和纳精囊形态差异分析	39
3.1 材料与方法	39
3.1.1 材料	39
3.1.2 测定方法	40
3.1.3 数据分析	40
3.2 结果与分析	42
3.2.1 日本囊对虾卵巢、肝胰腺及纳精囊的形态特征	42
3.2.2 表型统计量分析	43
3.2.3 不同形态变异类型日本囊对虾的性腺发育差异分析	44
3.2.4 不同形态变异类型日本囊对虾的纳精囊形态差异分析	46
3.3 讨论	51
第 4 章 结论	53
参考文献	55
致谢	65

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	III
List of abbreviation	V
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Genetic diversity	1
1.1.1 Definition and significance of genetic diversity.....	1
1.1.2 Research methods of genetic diversity.....	2
1.2 Microsatellite	5
1.2.1 Introduction of SSR.....	5
1.2.2 The application of SSR in shrimp	6
1.3 Review in <i>Marsupenaneus japonicus</i>	12
1.3.1 Taxonomic status and morphological characteristics	12
1.3.2 Geographical distribution and behavioral ecology	15
1.3.3 Gonad Development.....	16
1.3.4 Research of <i>Marsupenaneus japonicus</i>	18
1.4 Scientific purposes of this study	21
Chapter 2 Genetic diversity analysis of microsatellite DNA in different varieties of <i>Marsupenaneus japonicus</i>	22
2.1 Materials	22
2.1.1 Sample collection	22
2.1.2 Main apparatus	23
2.1.3 Main reagent.....	24
2.1.4 Confection of solution in common use	24
2.2 Methods	25
2.2.1 Extraction of genome DNA	25

Content

2.2.2 Polymorphism detection	25
2.2.3 Polyacrylamide gel electrophoresis	27
2.2.4 Data analysis.....	28
2.3 Results	28
2.3.1 Results and analysis of PCR amplification	28
2.3.2 Analysis of genetic diversity.....	29
2.3.3 Analysis of genetic differentiation	32
2.4 Discussion	35
2.4.1 Analysis of genetic diversity.....	35
2.4.2 Hardy-Weinberg balance	36
2.4.3 Analysis of genetic differentiation	36
Chapter 3 Analysis of morphological variations between two varieties of <i>Marsupenaneus japonicus</i> from the Chinese coast.....	39
3.1 Materials and methods	39
3.1.1 Materials.....	39
3.1.2 Measuring method	40
3.1.3 Main apparatus	40
3.2 Results and analysis.....	42
3.2.1 Materials.....	42
3.2.2 Phenotype statistics analysis.....	43
3.2.3 Variance analysis of gonad development	44
3.2.4 Variance analysis of morphological parameters of spermatheca	46
3.3 Discussion	51
Chapter 4 Conclusion	53
References.....	55
Acknowledgements.....	65

摘 要

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 是我国重要的经济养殖品种, 广泛分布于印度—西太平洋海域, 在我国的东海和南海均有分布。Tsio et al (2005) 根据头胸甲斑纹的形态特征将日本囊对虾分为 2 种不同形态变异类型, 头胸甲侧面的斑纹延伸至头部腹面的为形态变异类型 I, 头胸甲侧面的斑纹延伸至头胸甲侧面中部的为形态变异类型 II。形态变异类型 I 主要分布在日本海、中国东海和南海北部, 而形态变异类型 II 则广泛分布于东南亚、地中海和澳大利亚。本文采集了浙江舟山 (ZS)、福建厦门 (XM)、广东惠来 (HLQ 及 HLB)、广西北海 (BH) 和海南陵水 (LS) 6 个群体 2 种形态变异类型的日本囊对虾, 分别从 DNA 分子水平和形态水平探讨我国沿海 6 个群体 2 种形态变异类型日本囊对虾的遗传多样性和形态差异。主要结果如下:

(1) 以浙江舟山、福建厦门、广东惠来、海南陵水和广西北海 6 个群体 2 种形态变异类型的日本囊对虾为实验对象, 用 9 对微卫星引物对其进行遗传分析, 探讨了日本囊对虾的种质资源状况。结果表明: 9 个位点在 6 个日本囊对虾群体中均为高度多态 ($PIC > 0.5$), 共检测出 235 个等位基因; 6 个群体平均等位基因数在 13.2-17.7; PIC 平均值在 0.8512-0.9035; 平均观测杂合度 (H_o) 在 0.7296-0.7889, 平均期望杂合度 (H_e) 在 0.8805-0.9251; 表明所检测的群体遗传多样性水平较高。Hardy-Weinberg 平衡检测显示, 6 个群体普遍存在杂合子缺失现象。分子变异方差分析 (AMOVA) 结果表明, 遗传变异 6.94% 来自群体间, 93.06% 来自群体内。由 ZS、XM 和 HLQ 群体组成的形态变异类型 I 与由 HLB、LS 和 BH 群体组成的形态变异类型 II 之间的 F_{st} 均大于 0.05, 发生了中等程度的遗传分化; 相同形态变异类型各群体间的 F_{st} 均小于 0.05, 遗传分化不显著。日本囊对虾群体间的遗传距离 (D_A) 为 0.1785-0.6218; UPGMA 聚类分析表明, BH 群体和 LS 群体遗传距离最小, 亲缘关系最近, 它们首先聚在一起, 然后与 HLB 群体聚为一支; XM 群体和 HLQ 群体先聚在一起, 再与 ZS 群体聚为另一支, 聚类关系符合距离隔离模式。

(2) 通过测量日本囊对虾雌性亲虾 III-V 期性腺的性腺指数和肝胰腺指数以

及体长、纳精囊长、宽、高等形态性状参数，应用多元分析方法对 2 种形态变异类型的日本囊对虾进行了比较分析。结果表明：2 种形态变异类型日本囊对虾的性腺指数差异不显著，但肝胰腺指数差异显著；2 种形态变异类型日本囊对虾的纳精囊形态差异显著；采用逐步判别的方法建立了识别 2 种形态变异类型雌性亲虾的判别函数，且判别正确率达 89.7%。

关键词：日本囊对虾；形态差异；微卫星；遗传多样性

Astract

Marsupenaneus japonicus is one of the important species in shrimp fisheries and aquaculture in China. Two morphologically similar varieties (I and II) with distinct color banding patterns on the carapace are recognized from the South China Sea. In this study, we use morphological indices and microsatellite makers to analyze the variation between the two varieties of *M. japonicus* in China coastal areas. The main results are shown as follows:

1 9 pairs of microsatellite makers were used to detect the genetic diversities from two varieties of 6 wild stocks of *M. japonicus*, i.e. Zhoushan (ZS) stock in Zhejiang province, Xiamen (XM) stock in Fujian province, Huilai (HLQ and HLB) stock in Guangdong province, Lingshui (LS) stock in Hainan province and Beihai (BH) stock in Guangxi province. The results indicated: a total of 235 alleles were obtained from 9 makers in the 6 stocks, polymorphic information content (*PIC*) value per locus was morer than 0.5, indicating the 9 loci seemed highly polymorphic. Basic data statistics showed that the mean observed alleles in each stock ranged from 13.2 to 17.7. The mean observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.7296 to 0.7889 and the mean expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.8805 to 0.9251. Average polymorphism information content (*PIC*) ranged from 0.8512 to 0.9035, explained high level of genetic diversity in 6 wild stocks. 42.6% of stock loci showed significant deviation from the Hardy-Weinbery balance, and there was heterozygosity deficiency in all stocks. The pair-wise genetic differentiation (F_{st}) in 6 stocks of *M. japonicus* ranged from 0.0118 to 0.0911, detected significant genetic differentiation among the 6 stocks. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the variation within stocks was 93.06%, whereas the variation among stocks displayed 6.94% of the total variation. The genetic distance among stocks ranged from 0.1785 to 0.6218. Cluster analysis based on D_A indicated that HLB, BH and LS stocks were clustered as one cluster while ZS, XM and HLQ were gathered in anther group.

2 Morphological variations of gonad development and spermatheca traits between two varieties of *M. japonicus* in China coastal areas were compared using multiple regression analysis. Results showed that there was no significant variation of *GSI* between the two varieties in the whole gonadal development stages while there

was significant variation of *HPI* between two varieties; and variation of spermatheca traits was significant. Discriminant analysis based spermatheca traits revealed that there was significant difference between two varieties. Fisher's linear discriminant functions of two varieties were established, and the total discriminant accuracy of two varieties was 89.7%. The result of this research could be used in discrimination of different varieties of *M. japonicus*.

Key Words: *Marsupenaneus japonicus*; Morphological variations; Microsatellite; Genetic diversity.

缩略语中英文对照表

A	adenine	腺嘌呤
AFLP	amplified fragment length polymorphisms	扩增片段长度多态性
AMOVA	analysis of molecular variance	分子方差分析
ANCOVA	analysis of covariance	协方差分析
ANOVA	analysis of variance	方差分析
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
ATP	adenosine-triphosphate	三磷酸腺苷
bp	base pair	碱基对
C	cytosine	胞嘧啶
cm	centimeter	厘米
d	day	天
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
D _A	genetic distance	遗传距离
Df	degree of freedom	自由度
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid	乙二胺四乙酸
F_{is}	inbreeding coefficient	近交系数
F_{st}	genetic differentiation index	遗传分化指数
g	gram	克
G	guanine	鸟嘌呤
GSI	gonadosomat icindex	性腺指数
h	hour	小时
H_e	expected heterozygosity	预期杂合度
H_o	observed heterozygosity	观测杂合度

缩略语中英文对照表

<i>HPI</i>	hepatosomat icindex	肝胰腺指数
L	litre	升
m	meter	米
min	minutes	分钟
mm	millimeter	毫米
mtDNA	mitochondrial DNA	线粒体 DNA
MAS	marker assisted selection	标记辅助选择
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
mL	minilitre	毫升
<i>Na</i>	number of alles	等位基因数目
ng	nanogram	纳克
P	percent value	百分比
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCA	principal components analysis	主成分分析
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
<i>PIC</i>	polymorphism information content	多态信息含量
QTL	quantitative trait locus	数量性状位点
RAPD	random amplified polymorphic DNA	随机扩增多态 DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
rpm	revolutions per minute	转/分
s	second	秒
SDS	sodium dodecylsulfate	十二烷基硫酸钠
Sig.	significance	统计显著性
SNP	single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
SPSS	statistical product and service solutions	统计产品与服务解决方案
SSLP	simple sequence length	简单序列长度多态性

缩略语中英文对照表

	polymorphism	
SSR	simple sequence repeat	简单重复序列
STR	short tandem repeats	短串重复
T	thymine	胸腺嘧啶
TBE	Tris/Borate/EDTA	Tris-硼酸缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
T _m	melting temperature DNA	变性温度
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三(羟甲基)氨基甲烷
μg	microgram	微克
U	unit	活性单位
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean	非加权组平均法
VNTR	variable number of tandem repeats	数目可变串联重复序列

第1章 绪论

1.1 遗传多样性

1.1.1 遗传多样性含义及研究意义

生物多样性是指栖息于一定环境的所有动植物和微生物物种、每个物种所拥有的全部基因以及它们与生存环境所组成的生态系统的总称。生物多样性包括遗传（基因）多样性、物种多样性、生态系统多样性和景观多样性，是近年来国际社会讨论的一个热门话题。其内容涉及生物多样性的形成、现状及其评价；生物多样性消失的原因及其深远影响；生物多样性的保护和保存等。其中遗传多样性（包括微生物、植物、动物和人的遗传多样性）是生物多样性的核心，是物种多样性和生态多样性的基础。物种是构成生态群落进而组成生态系统的基本单元，生态系统的多样性离不开物种多样性，同样也离不开不同物种所具有的遗传多样性（田兴军，2005）。

遗传多样性（genetic diversity）在广义上是指种内或种间表现在分子、细胞、个体三个水平的遗传变异度，狭义上则主要是指种内不同群体和个体间的遗传多态性程度。从某种意义上来看，一个物种就是一个独特基因的多样性。但我们所说的基因多样性或遗传多样性又远远超出了物种多样性的范围，或者说物种的多样性还远远不能包含全部基因多样性的内容。基因多样性或遗传多样性的表现是多层次、多水平的（朱有勇，2007）。

遗传多样性的研究具有重要的理论和实际意义。首先，遗传多样性是物种以上各水平多样性的重要来源，是生命进化和适应的基础。种内的多样性越丰富，物种对环境变化的适应能力就越大，其进化的潜力也越大。对遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史，也能为进一步分析其进化潜力和未来命运提供重要资料，尤其有助于物种稀有或濒危原因及过程的探讨。其次，遗传多样性是保护生物学的核心之一。对种内遗传变异的大小、时空分布及其与环境条件关系的了解可以帮助我们采取科学有效的措施来保护人类赖以生存的遗传资源，对珍稀物种保护方针和措施的制订也都有赖于我们对物种遗传多样性的认识。再

次,对遗传多样性的认识是生物各分支学科重要的背景资料。对遗传多样性的研究无疑有助于人们更清楚的认识生物多样性的起源和进化,为动植物的分类、进化研究提供有益的资料,进而为动植物育种和遗传改良奠定基础(田兴军,2005;朱有勇,2007)。

1.1.2 遗传多样性研究方法

研究遗传多样性的方法是随着生物学研究层次的提高和实验手段的不断改进逐步发展起来的,从19世纪孟德尔用纯表现型性状分析遗传差异到今天多种多样的分子手段,遗传多样性研究经历了从简单到复杂、从宏观到微观、从定性到定量的发展过程。研究遗传多样性的方法从形态学水平、细胞学(染色体)水平、等位酶水平、直到目前的分子水平(季维智等,1999)。无论在哪个层次上研究遗传多样性,其目的都是为了揭示遗传物质的变异。迄今为止,任何一种检测遗传变异的方法都存在各自的优点和局限,还找不到一种可以完全取代其它方法的技术(岳天祥,2001)。目前,常用的遗传标记有很多种,按照一般的观点可以分为形态标记(morphological marker),细胞标记(cytological marker),生化标记(biochemical marker)和分子标记(molecular marker)。

形态学方法,是从形态学或表型性状上研究遗传变异是最古老、最简便易行的方法,具有取样方便、操作简单、易于分析等优点。Tzeng et al (2002)采用多元异速生长分析对台湾周边的5个日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)种群进行分析,结果表明,不同性别之间的差异显著,同一性别不同地理种群的差异不显著。李朝霞等(2006)通过对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海1号”选育群体和野生群体的形态特征进行分析,认为2个群体间的形态特征差异显著,主要反映在选育对虾的腹节1及腹节总长度增加,但头胸甲及腹节1的宽度降低。孙成波等(2009)采用聚类分析、判别分析和因子分析3种多元分析方法对来源于美国的4个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)种群的13个形态比例参数进行比较研究,发现Kona Bay种群与Molokai种群形态差异很小,应属于同一种群,而SIS种群、OI种群趋异程度逐渐增加,为独立的种群,4个种群凡纳滨对虾的形态差异主要集中在头胸甲与第1腹节上。游欣欣等(2011)采用多元分析方法分别对不同地理群体和不同形态变异类型日本囊对虾的形态

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库